

# Uji Kesesuaian Sistem, Spesifitas, Linearitas dan Presisi pada Penetapan Kadar Vitamin E 75 HP dalam Bahan Awal Vitamin E 75 HP secara *Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) Ultraviolet Detection*

Arum Widiasmara<sup>1\*)</sup>, Amelia Pratiwi<sup>1)</sup>, dan Achmad Nandang Roziafanto<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Prodi Analisis Kimia Politeknik AKA Bogor, Jl. Pangeran Sogiri No. 283, Bogor, Indonesia 16158

<sup>2)</sup>Prodi Nanoteknologi Pangan Politeknik AKA Bogor, Jl. Pangeran Sogiri No. 283, Bogor, Indonesia 16158

\* Email : arumwidyasmara@gmail.com

(Received : 17 November 2025 ; Accepted: 30 Desember 2025 ; Published: 31 Desember 2025)

## Abstrak

*Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)* merupakan metode analisis dengan efisiensi tinggi, cepat, dan sensitif. Namun, metode penetapan kadar Vitamin E 75 HP pada bahan awal Vitamin E 75 HP secara UHPLC sebelumnya belum tervalidasi, sehingga perlu dilakukan pengujian beberapa parameter kinerja metode yang mendukung validasi metode seperti: uji kesesuaian sistem, uji spesifitas, linieritas, akurasi, presisi, batas deteksi dan batas kuantitasi. Analisis dilakukan menggunakan sistem UHPLC UV Detector menggunakan kolom Bondapack C<sub>18</sub> (150 mm x 3,9 mm) dengan fase gerak terdiri dari kombinasi metanol:purified water:asam asetat dengan perbandingan (97:2:1), laju alir 1,5 mL/menit, volume injeksi 10 µL, dan panjang gelombang 284 nm. Pada uji kesesuaian sistem didapatkan nilai % RSD 0,77%, uji spesifitas memperlihatkan tidak ada satupun peak pada solvent maupun fase gerak, uji linieritas pada konsentrasi 70%,80%,90%,100%,110% dan 120% menunjukkan nilai koefisien korelasi 0,9992. Uji akurasi pada larutan standar 80%,100% dan 120% berturut turut 100,21%, 100,66% dan 100,44%. Nilai %RSD pada uji riptabilitas dan presisi antara berturut turut 1,21% dan 1,34%. Berdasarkan hasil penetapan bahan awal Vitamin E 75 HP secara UHPLC terhadap parameter uji kesesuaian sistem, spesifitas, linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi dan batas kuantitasi teoritis telah memenuhi syarat keberterimaan.

Kata kunci: *Ultra High Performance Liquid Chromatography*; Vitamin E; linieritas; akurasi; presisi

## Abstract

*Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)* is an analytical method with high efficiency, fast, and sensitive. However, the method of determining the level of Vitamin E 75 HP in the starting material of Vitamin E 75 HP by UHPLC has not been previously validated, so it is necessary to examine several parameters that support method validation such as: system suitability test, specificity test, linearity, accuracy, precision, detection limit and quantitation limit. The analysis was carried out using a UHPLC UV Detector system using a Bondapack C<sub>18</sub> column (150 mm x 3.9 mm) with a mobile phase consisting of a combination of methanol: purified water: acetic acid with a ratio of (97:2:1), a flow rate of 1.5 mL/min, an injection volume of 10 µL, and a wavelength of 284 nm. In the system suitability test, the % RSD value was 0.77%, the specificity test showed no peaks in the solvent or mobile phase, the linearity test at concentrations of 70%, 80%, 90%, 100%, 110% and 120% showed a correlation coefficient value of 0.9992. The accuracy test on standard solutions of 80%, 100% and 120% was 100.21%, 100.66% and 100.44%, respectively. The % RSD value in the repeatability and precision tests was 1.21% and 1.34%, respectively. Based on the method for determining the levels starting material of Vitamin E 75 HP by UHPLC against the system suitability test parameters, specificity, linearity, accuracy, precision, detection limits and quantitation limits qualify the acceptance requirements.

**Keyword:** *Ultra High Performance Liquid Chromatography*; Vitamin E; linearity ; accuracy; precision

## PENDAHULUAN

Vitamin E adalah istilah yang digunakan untuk menggambarkan 8 jenis tokoferol (T) dan tokotrienol (T3) yang larut dalam lemak, dengan alfa-tokoferol sebagai yang paling aktif secara biologis. Vitamin E bertindak sebagai antioksidan, melindungi membran sel dari kerusakan oksidatif. Efek antioksidannya saat ini sedang diteliti untuk digunakan dalam pengobatan penyakit yang menyebabkan kehilangan massa tulang, penyakit kardiovaskular, diabetes melitus dan komorbiditas terkait, penyakit mata, penyakit inflamasi (termasuk kondisi kulit), gangguan lipid, penyakit neurologis, dan kerusakan akibat radiasi (Pubchem, 2025)

Analisis vitamin E biasanya dilakukan dengan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) atau kromatografi gas (GC) (Kemenkes RI, 2020). Umumnya, metode GC memerlukan prosedur derivatisasi untuk meningkatkan volatilitas. Reaksi derivatisasi ini seringkali menghasilkan konversi senyawa yang tidak lengkap dan produk sampingan pengganggu yang tidak diinginkan. Oleh karena itu, HPLC adalah teknik yang paling umum digunakan untuk analisis T dan T3 (Wong, 2014). Tokoferol stabil dalam kondisi HPLC, mudah larut dalam pelarut yang sesuai, dan ada beberapa detektor yang dapat dikombinasikan dengan HPLC untuk mendeteksi tokoferol. Deteksi fluoresensi (FLD) dan deteksi ultraviolet (UV) adalah yang paling umum digunakan dalam analisis makanan dan pakan (Lampi, 2019).

*Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) merupakan versi terbaru dari *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Secara prinsip dasar keduanya sama, Analisis menggunakan metode UHPLC terbukti jauh lebih menguntungkan dan meningkatkan efisiensi dibandingkan dengan metode konvensional HPLC. Efisiensi tersebut berupa penurunan waktu analisis, jumlah sampel dan fase gerak yang dibutuhkan, serta biaya. Selain itu, keuntungan dari metode UHPLC adalah peningkatan sensitivitas yang ditunjukkan dengan penurunan nilai LOD dan LOQ dibandingkan dengan metode HPLC konvensional (Annisa et al., 2013).

Metode penetapan kadar pada bahan awal Vitamin E 75 HP secara *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) sebelumnya belum tervalidasi, sehingga perlu dilakukan pengujian beberapa parameter kinerja metode yang mendukung validasi metode seperti: uji kesesuaian sistem, uji spesifitas, linieritas, akurasi, presisi, batas deteksi dan batas kuantitasi (ICH, 2022).

## METODOLOGI

### Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini terdiri dari bahan uji dan bahan kimia. Bahan uji yang digunakan dalam percobaan ini adalah Baku Pembanding Kerja (BPK) Vitamin E 75 HP, bahan

awal Vitamin E 75 HP, *purified water*, metanol, asam asetat, dan etanol.

Alat yang digunakan adalah HPLC UV-VIS, timbangan analitik, kolom HPLC C18; 250 x 4,6 mm, labu takar 100 mL dan 1000 mL, pipet volume (1,00; 2,00; 5,00; 7,00; 8,00; 9,00; 10,00)mL, gelas ukur 1000 mL, pipet tetes, dan *Sonicor*.

### Cara Kerja

#### Tahap Preparasi

##### **Pembuatan Solvent**

Etanol dan asam asetat dicampur dengan perbandingan 99:1 dan diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer*.

##### **Pembuatan Fase Gerak**

Metanol, *purified water* dan asam asetat dicampur dengan perbandingan 97:2:1, diaduk menggunakan *magnetic stirrer*, disonikasi selama  $\pm 15$  menit dan disaring dengan membran filter 0,45  $\mu\text{m}$ .

##### **Pembuatan Larutan Standar Induk Vitamin E 75 HP 5,0 mg/mL**

Baku Pembanding Kerja (BPK) Vitamin E 75 HP ditimbang tepat 1000 mg, dimasukkan kedalam labu tentukur 200 mL, ditambahkan dengan 20 mL *purified water*, disonikasi hingga larut, kemudian diencerkan dengan *purified water* hingga tanda batas, dan dihomogenkan (konsentrasi larutan 5,0 mg/mL).

##### **Pembuatan Larutan Deret Standar Vitamin E**

Pembuatan larutan deret standar vitamin E dengan konsentrasi (70,0; 80,0; 90,0; 100,0; 110,0; dan 120,0)% dengan memipet larutan induk 5,0 mg/mL masing-masing (7,00; 8,00; 9,00; 10,00; 11,00; dan 12,00) mL. Selanjutnya dimasukkan ke dalam labu tentukur 50 mL, ditambahkan solvent hingga tanda batas, dihomogenkan dan disaring masing-masing larutan dengan *membrane filter* 0,45  $\mu\text{m}$ .

##### **Penyiapan Larutan Uji**

Sampel Vitamin E 75 HP (*dry*) ditimbang teliti 50,0 mg ke dalam labu ukur 50 mL, ditambahkan 5 mL *purified water*, dihomogenkan, ditambahkan *solvent* hingga tepat 50 mL dan dikocok. Selanjutnya larutan uji disaring dengan *membrane filter* 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### Tahap Pengujian

##### **Pengondisian UHPLC**

Instrumen UHPLC yang digunakan adalah UHPLC dengan merk *Ultimate 3000 Basic* dengan kondisi pengoperasian berdasarkan metode dalam percobaan sebagai berikut :

Kolom	: <i>bondapack</i> C18
Panjang kolom	: 150 mm
Diameter kolom	: 3,9 mm

Fase gerak : metanol : *purified water* : asam asetat (97:2:1)  
 Teknik alir : isokratik  
 Laju alir : ±1,5 mL/menit  
 Volume injeksi : 10 µL  
 Waktu akhir injeksi : 5 menit  
 Waktu retensi : ± 2,5 menit  
 Detektor : UV  
 Panjang gelombang : 284 nm  
 Cara injeksi : *auto injector*

### Uji Kesesuaian Sistem

Sistem HPLC dikondisikan ± 30 menit dengan methanol, kemudian dialirkan fase gerak minimum 1 jam sebelum dilakukan injeksi. Larutan standar diinjeksi 5 µL sebanyak 6 kali. Dihitung nilai %RSD.

### Spesifisitas (*specificity*)

Tahap pengujian ini dilakukan dengan menginjeksi larutan standar, *solvent*, dan fase gerak ke dalam HPLC. Berdasarkan data yang didapat, kriteria penerimaan adalah tidak ada peak yang mengganggu pada kisaran waktu retensi vitamin E.

### Linearitas (*linearity*)

Tahap uji linieritas dilakukan dengan pengukuran luas area masing-masing larutan deret standar vitamin E dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi yaitu (70,0; 80,0; 90,0; 100,0; 110,0; dan 120,0)% menggunakan UHPLC.

Berdasarkan data yang didapat maka akan diperoleh hubungan antara konsentrasi dan luas area dalam bentuk kurva linier sehingga dapat ditentukan koefisien korelasi, *slope* dan *intersept*. Kriteria penerimaan adalah nilai koefisien korelasi ( $r$ ) ≥ 0,997.

### Akurasi (*accuracy*)

Pengujian dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar vitamin E konsentrasi 80%, 100%, dan 120% kedalam sistem UHPLC dan lakukan sebanyak 3 kali pengulangan.

Data hasil pengujian dapat dihitung nilai %Recovery dengan kriteria penerimaan %Recovery (98,0-102,0)% dan %RSD dari semua konsentrasi ≤ 2,0 %.

### Presisi (*precision*)

#### Ripitabilitas

Pengujian ini dilakukan dengan menginjeksikan larutan standar dan larutan uji sebanyak 6 kali ulangan. Kadar yang diperoleh dihitung kadarnya dan % RSD. Kriteria penerimaan pengujian ini adalah %RSD ≤ 2,0 %.

#### Presisi Antara

Uji presisi antara dilakukan dengan prosedur yang sama dengan uji presisi, tetapi dilakukan oleh analis yang berbeda. Pengujian pada masing-

masing analis dilakukan 6 kali ulangan. Kadar yang diperoleh dilakukan pengolahan data menggunakan uji-F. Syarat keberterimaan pengujian ini adalah P value uji F test antara hasil analisa oleh analis pertama dan kedua > 0,05.

### Tahap Pengolahan Data

#### Linearitas (*linearity*)

Linieritas ditentukan dengan pengujian larutan deret standar vitamin E pada konsentrasi yang telah ditentukan. Berdasarkan data yang diperoleh dibuat kurva linieritas dan ditentukan nilai koefisien korelasi ( $r$ ), *slope* ( $b$ ), dan *intercept* ( $a$ ) sehingga dapat sebuah persamaan dengan rumus sebagai berikut :

$$y = a + bx$$

Keterangan:

y : Luas area

a : *Intercept*

b : *Slope*

x : Konsentrasi (mg/mL )

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

$$a = \frac{\sum y - (b \sum x)}{n}$$

$$b = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum (x - \bar{x})^2}$$

Keterangan:

x : Konsentrasi (mg/mL )

y : Luas area

n : Banyaknya data

$\bar{x}$  : Rerata konsentrasi (mg/mL)

$\bar{y}$  : Rerata luas area

### Akurasi (*accuracy*)

Akurasi ditentukan dengan pengujian larutan standar vitamin E dengan konsentrasi (80; 100; 120)% (b/v) sebanyak tiga kali ulangan. Berdasarkan data yang diperoleh dapat ditentukan %Recovery menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\%Recovery = \frac{\text{konsentrasi yang diperoleh}}{\text{konsentrasi yang ditentukan}} \times 100\%$$

### Presisi (*precision*)

#### Ripitabilitas

Presisi ditentukan dengan pengujian larutan sampel vitamin E yang dilakukan sebanyak 6 kali ulangan. Data yang diperoleh dapat ditentukan nilai kadar rerata, SD, dan RSD. Perhitungan ini menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n - 1)}}$$

$$\%RSD = \frac{SD \times 100\%}{\bar{x}}$$

Keterangan:

$\Sigma x$  : Jumlah konsentrasi (mg/mL)  
 n : Banyaknya data  
 $\bar{x}$  : Rerata konsentrasi (mg/mL)  
 SD : Standar deviasi (mg/mL)  
 %RSD : Standar deviasi relatif (%)

### Presisi Antara

Perhitungan untuk presisi antara dilakukan dengan uji-F (uji ragam) dan uji-t (uji rata-rata).

#### a. Uji F

Uji F digunakan untuk membandingkan keragaman suatu populasi dengan keragaman populasi lainnya yang berfungsi sebagai sebagai evaluasi ketelitian (presisi) dari 2 kumpulan data yang dilihat dari hasil nilai SD (*Standar Deviasi*). Uji F dapat dilakukan dengan langkah-langkah sebagai berikut:

##### 1. Penentuan Hipotesis

$H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$  (SD hasil pengukuran antara analisis 1 dan analisis 2 tidak berbeda nyata)

$H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$  (SD hasil pengukuran antara analisis 1 dan analisis 2 berbeda nyata)

##### 2. Menetapkan tingkat kepercayaan

3.  $F_{hitung} = \frac{SD_1^2}{SD_2^2}$ ,  $SD_1^2 > SD_2^2$

4.  $F_{tabel} = (\alpha, db1, db2)$ ;  $db = n-1$

##### 5. Kesimpulan

- $F_{hitung} < F_{tabel}$  maka terima  $H_0$  = presisi perlakuan 1 tidak berbeda nyata dengan perlakuan 2

- $F_{hitung} \geq F_{tabel}$  maka tolak  $H_0$  = presisi perlakuan 1 berbeda nyata dengan perlakuan 2

#### b. Uji-t

Uji-t digunakan untuk membandingkan rata-rata dua populasi yang berfungsi sebagai evaluasi ketepatan (akurasi). Uji-t yang digunakan pada percobaan ini adalah uji-t biasa (apabila menggunakan sampel, metode, dan instrumen yang sama namun perlakuan sampel dari awal sudah berbeda sehingga nilainya tidak saling memengaruhi). Berikut tahapan perhitungannya:

##### 1. Penentuan Hipotesis

$H_0 : \mu_1 = \mu_2$  (rata-rata hasil uji yang diperoleh perlakuan 1 tidak berbeda nyata dengan perlakuan 2)

$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$  (rata-rata hasil uji yang diperoleh perlakuan 1 berbeda nyata dengan perlakuan 2)

##### 2. Menetapkan tingkat kepercayaan

##### 3. Menghitung $S_{gab}$

$$S_{gab} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}}$$

Keterangan:

$n_1$  : Banyaknya data analisis 1

$n_2$  : Banyaknya data analisis 2

$S_1$  : Standar deviasi kadar hasil analisis 1 (%(b/v))

$S_2$  : Standar deviasi kadar hasil analisis 2 (%(b/v))

#### 4. Menentukan $t_{hitung}$

$$t_{hitung} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{S_{gab} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Keterangan:

$\bar{x}_1$  : Rata-rata kadar hasil analisis 1 (%)

$\bar{x}_2$  : Rata-rata kadar hasil analisis 2 (%)

$S_{gab}$  : Simpangan baku gabungan (%)

#### 5. $t_{tabel} = (\alpha; db)$ ; $db = n_1 + n_2 - 2$

Keterangan:

$\alpha$  : taraf nyata

$db$  : derajat bebas

$n$  : banyaknya ulangan

#### 6. Kesimpulan:

- $t_{hitung} < t_{tabel}$  maka terima  $H_0$  = rata-rata hasil uji yang diperoleh analisis 1 tidak berbeda nyata dengan analisis 2

- $t_{hitung} \geq t_{tabel}$  maka tolak  $H_0$  = rata-rata hasil uji yang diperoleh analisis 1 berbeda nyata dengan analisis 2

### **Batas deteksi (*limit of detection*)**

Batas deteksi dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari hasil uji parameter linearitas dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S}$$

Keterangan :

$\sigma$  : Simpangan baku respon (dari data linearitas)

$S$  : Slope kurva baku kalibrasi analit (b pada persamaan regresi linear)

### **Batas kuantitasi (*limit of quantitation*)**

Batas kuantitasi dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari hasil uji parameter linearitas dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

Keterangan :

$\sigma$  : Simpangan baku respon (dari data linearitas)

$S$  : Slope kurva baku kalibrasi analit (b pada persamaan regresi linear)

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Parameter yang harus dipenuhi dalam validasi metode diantaranya spesifisitas (*specificity*), linearitas (*linearity*), akurasi (*accuracy*), presisi (*precision*), batas deteksi (*limit of detection*) dan batas kuantitasi (*limit of quantitation*) dengan syarat keberterimaan berdasarkan *ICH Validation of Analytical Procedures* dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Syarat Keberterimaan Metode Validasi

Parameter Validasi	Kriteria Penerimaan
Spesifisitas	Tidak ada <i>peak</i> yang mengganggu pada kisaran waktu retensi Vitamin E 75 HP
Linearitas	Koefisien korelasi lebih besar atau sama dengan 0,997
Akurasi	Persen <i>recovery</i> (perolehan kembali) 98 – 102 % RSD ≤ 2 %
Presisi	
Ripitabilitas	RSD ≤ 2 %
Presisi antara	RSD ≤ 2 %
LOD	3,3 σ/S
LOQ	10 σ/S

## Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem bertujuan untuk memastikan bahwa prosedur analisis didasarkan pada konsep peralatan, instrumen, elektronik dan pelaksanaan analisis dan contoh uji merupakan suatu sistem integral. Pengujian ini dilakukan dengan melakukan injeksi standar sebanyak 6 kali, kemudian hasilnya dihitung dalam bentuk %RSD pada luas area. Data hasil uji kesesuaian sistem dapat ditunjukkan pada Tabel 2.

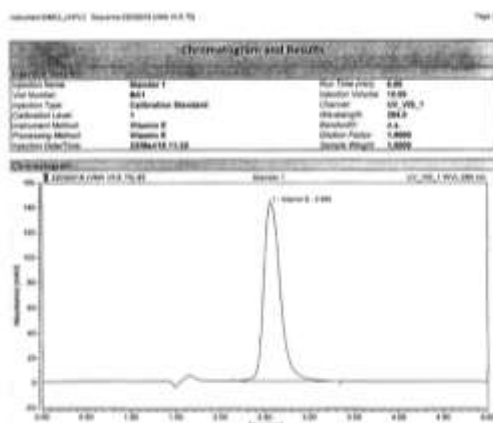
Tabel 2. Hasil Uji Kesesuaian Sistem

No.	Luas Area
1	30,754
2	30,827
3	30,523
4	30,356
5	30,750
6	31,027
Rata-rata	30,706
RSD (%)	0,77
Syarat keberterimaan RSD ≤ 2%	

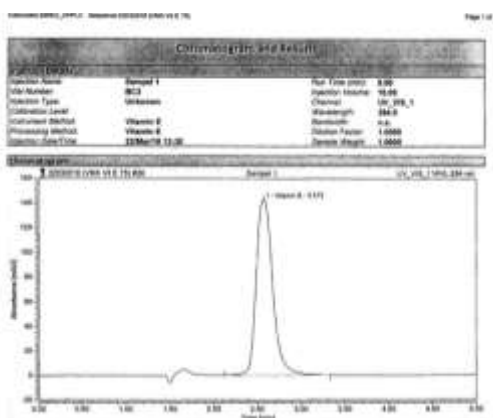
Dari data tabel diatas dapat dilihat bahwa Vitamin E menghasilkan nilai %RSD kurang dari 2% pada luas area, hal ini menunjukkan bahwa sistem pada metode ini telah stabil sehingga tidak terjadi suatu penyimpangan pada setiap pengukuran. Nilai tersebut juga telah memenuhi syarat keberterimaan pada uji kesesuaian sistem, maka sistem yang digunakan pada metode uji telah sesuai dan berjalan efektif.

## Spesifisitas

Spesifisitas adalah kemampuan untuk menilai dengan jelas analit diantara adanya komponen lain didalam suatu sampel. Komponen ini biasanya merupakan impuritas, hasil urai atau matriks sampel, dan lain-lain. Pengujian dilakukan dengan cara menginjeksikan larutan perbandingan, *solvent* dan fase gerak dalam sistem KCKT. Data hasil uji spesifisitas dapat dilihat pada Gambar 1, Gambar 2 dan Tabel 3



Gambar 1. Kromatogram Spesifitas Standar



Gambar 2. Kromatogram Spesifitas Sampel

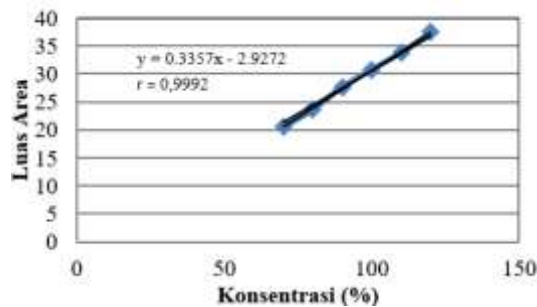
Tabel 3. Hasil Uji Spesifisitas

Larutan	Waktu Retensi (menit)
Standar	2,565
Fase Gerak	-
<i>Solvent</i>	-
Uji	2,573

Berdasarkan data tabel diatas menunjukkan bahwa larutan standar memiliki waktu retensi 2,565 menit dan larutan uji pada waktu retensi 2,573 menit. Hasil tersebut memperlihatkan bahwa tidak ada satupun *peak* pada *solvent* maupun fase gerak. Dengan demikian, pengujian ini telah memasuki syarat keberterimaan, sehingga dapat dipastikan metode uji ini sudah sesuai dan digunakan karena dapat mendeteksi Vitamin E secara spesifik.

**Linearitas (*linearity*)**

Uji linearitas bertujuan untuk mengetahui kemampuan metode memberikan hasil (dalam batas rentang yang ditetapkan) dengan konsentrasi analit dalam sampel. Linieritas dihitung berdasarkan pengukuran luas area standar pada konsentrasi 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, dan 120%. Data hasil pengukuran linieritas dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Kurva Kalibrasi Kadar Vitamin E

Berdasarkan kurva pada Gambar 3, dapat dinyatakan bahwa konsentrasi berbanding lurus dengan luas area sampel, dengan nilai koefisien korelasi (*r*) adalah 0,9992. Nilai koefisien korelasi tersebut telah memenuhi syarat keberterimaan yaitu  $r \geq 0,997$ . Linearitas yang baik dinyatakan jika nilai koefisien korelasi mendekati 1 (Ramadhan dan Musfiroh, 2021).

**Akurasi (*Accuracy*)**

Akurasi mengetahui kedekatan hasil yang diperoleh terhadap nilai sesungguhnya dari suatu pengukuran atau analisis. Akurasi dihitung berdasarkan pengukuran sampel uji pada konsentrasi 80%, 100%, dan 120%. Data hasil pengukuran penetapan akurasi pada percobaan ini dilakukan dengan menggunakan uji perolehan kembali (*recovery*). Data hasil uji akurasi dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji Akurasi

Kandungan teoritis		Peak	Kadar	Recovery
(%)	mg/mL	Area	(mg/mL)	(%)
80	0,800	24,158	0,7867	98,34
		24,921	0,8116	101,45
		24,768	0,8066	100,83
Rata-rata				100,21
%RSD				1,64
Kandungan teoritis		Area	Kadar	Recovery
(%)	mg/mL		(mg/mL)	(%)
100	1,000	30,922	1,0070	100,70
		31,138	1,0141	101,41
		30,662	0,9986	99,86
Rata-rata				100,66
%RSD				0,77
Kandungan teoritis		Area	Kadar	Recovery
(%)	mg/mL		(mg/mL)	(%)
120	1,200	36,821	1,1991	99,93
		37,185	1,2110	100,92
		37,018	1,2056	100,46
Rata-rata				100,44
%RSD				0,49

Pada Tabel 4 diatas menyatakan bahwa larutan standar dengan konsentrasi 80%, 100%, dan 120% telah memenuhi syarat keberterimaan yaitu 98,0-102,0% sehingga metode uji penetapan kadar Vitamin E memiliki hasil yang akurat.

**Presisi (*Precision*)**

Presisi adalah tingkat variasi (kecocokan) antara hasil uji dari masing-masing sampel terpisah yang diambil dari satu *batch* bahan atau produk yang homogen. Presisi dilakukan dengan dua cara yaitu rিপিতাৰিতা and presisi antara.

**Ripitabilitas**

Ripitabilitas dilakukan dengan menginjektikan larutan pembanding sebanyak 6 kali dan masing-masing larutan uji sebanyak 1 kali, setelah itu dihitung kadar dan %RSD dari pengukuran. Hal ini dilakukan oleh analis dan pada kondisi yang sama. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel 5. Pada Tabel 5 diperoleh nilai %RSD pada kadar vitamin E sebesar 1,21%, yang menyatakan bahwa metode uji tersebut termasuk dalam tingkat teliti. Nilai tersebut memenuhi persyaratan yaitu persen RSD  $\leq 2\%$ . Hal ini

menginformasikan bahwa sistem operasional alat, pereaksi, dan analisis memiliki nilai presisi yang baik terhadap metode analisis dengan respon yang relatif konstan (Harmita, 2010).

Tabel 5. Hasil Uji Ripitabilitas

No	Luas Area	Kadar (%)
1	31,372	77,74
2	31,095	77,05
3	30,607	75,84
4	30,779	76,27
5	30,462	75,48
6	31,289	77,53
x	30,93	76,65
%RSD	<b>0,37</b>	<b>1,21</b>

### Presisi Antara

Pengukuran presisi antara dilakukan sama dengan ripitabilitas tetapi dengan analisis yang berbeda. Data presisi antara dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji Presisi Antara

No	Kadar (%)	
	Analisis 1	Analisis 2
1	77,74	75,61
2	77,05	77,59
3	75,84	75,54
4	76,27	76,42
5	75,48	77,26
6	77,53	74,58
Rata-rata	76,65	76,17
RSD	1,21	1,50
<b>Rata-rata</b>	<b>76,41</b>	
<b>SD</b>	<b>1,02</b>	
<b>%RSD</b>	<b>1,34</b>	
Syarat Keberterimaan	RSD ≤ 2,0%	

Pada Tabel 6 diperoleh nilai persen RSD sebesar 1,34%, yang menyatakan presisi dari metode uji termasuk dalam kategori teliti. Nilai tersebut memenuhi persyaratan yaitu persen RSD ≤ 2%. Hal tersebut menyatakan bahwa metode analisis ini dapat digunakan oleh analisis yang berbeda pada waktu tertentu.

Berdasarkan hasil tersebut, untuk lebih meyakinkan dilakukan pengolahan data secara statistika dengan menggunakan uji kesamaan ragam (uji-F) dan pengujian rataan dua sampel saling bebas (uji-t).

### Uji Kesamaan Ragam ( Uji-F)

- Hipotesis :

$H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$  (SD hasil pengukuran antara analisis 1 dan analisis 2 tidak berbeda nyata)

$H_1 : \sigma_1^2 \neq \sigma_2^2$  (SD pengukuran antara analisis 1 dan analisis 2 berbeda nyata)

- Tingkat kepercayaan yang digunakan sebesar 95%

$$3. F_{hitung} = \frac{SD_1^2}{SD_2^2} = \frac{1,14^2}{0,92^2} = 1,52$$

$$4. F_{tabel} = (α, db_1, db_2); db = n-1$$

$$F_{tabel} = (0,05, 5, 5) = 5,05$$

Berdasarkan hasil perhitungan uji-F diperoleh  $F_{hitung} < F_{tabel}$ , maka terima  $H_0$  yang menyatakan bahwa SD dari hasil uji yang diperoleh oleh analisis 1 tidak berbeda nyata dengan SD hasil uji yang diperoleh analisis 2. Hal tersebut menyatakan bahwa metode analisis ini dapat digunakan oleh analisis yang berbeda pada waktu tertentu.

### Uji Rataan Dua Sampel Saling Bebas (Uji-t)

- Penentuan Hipotesis

$H_0 : \mu_1 = \mu_2$  (rataan hasil uji yang diperoleh perlakuan 1 tidak berbeda nyata dengan perlakuan 2)

$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$  (rataan hasil uji yang diperoleh perlakuan 1 berbeda nyata dengan perlakuan 2)

- Tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95%

- 

$$S_{gab} = \sqrt{\frac{(6-1) \times 1,14^2 + (6-1) \times 0,92^2}{(n_1 + n_2 - 2)}} = 1,04$$

$$4. t_{hitung} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{S_{gab} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} = 0,81$$

$$5. t_{tabel} = (α; db); db = n_1 + n_2 - 2 = (0,05, 10) = 2,02$$

Berdasarkan hasil uji-t diperoleh  $t_{hitung} < t_{tabel}$ , maka terima  $H_0$  yang menyatakan bahwa rataan dari hasil uji yang diperoleh oleh analisis 1 tidak berbeda nyata dengan rataan hasil uji yang diperoleh analisis 2.

### Batas deteksi (*limit of detection*)

LOD adalah parameter yang digunakan untuk menunjukkan kadar zat aktif terendah yang dapat dideteksi secara kualitatif menggunakan metode uji tersebut. Limit deteksi metode digunakan untuk menentukan konsentrasi terkecil analit yang dapat menghasilkan respon yang nyata setelah melalui setiap tahapan dari metode uji secara lengkap.

Tabel 7. Linearitas Vitamin E 75 HP

	Konsentrasi		Luas Area
	%	mg/mL	
	70	0,7000	20,559
	80	0,8000	23,681
	90	0,9000	27,688
	100	1,0000	30,718
	110	1,1000	33,705
	120	1,2000	37,438

Dari hasil pengukuran, didapatkan hasil perhitungan sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{Korelasi (r)} &= 0,9992 \\ \text{Slope (b)} &= 33,5706 \\ \text{intercept} &= -2,9272 \\ \text{steyx} &= 0,2839 \\ \text{LOD} &= 0,0279 \\ \text{LOQ} &= 0,0846 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{LOD} &= \frac{3,3 \sigma}{S} \\ &= \frac{3,3 \times 0,2839}{33,5706} \\ &= 0,0279 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{LOQ} &= \frac{10 \sigma}{S} \\ &= \frac{10 \times 0,2839}{33,5706} \\ &= 0,0846 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Berdasarkan data pada Tabel 7 terlihat bahwa konsentrasi terendah dari analit yang masih dapat dideteksi oleh metode adalah sebesar 0,0279 mg/mL. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa analit dapat diukur dengan baik pada konsentrasi lebih besar dari 0,0279 mg/mL setelah melalui tahapan metode uji secara lengkap.

#### **Batas Kuantitasi (Limit of Quantitation/LOQ)**

LOQ adalah parameter yang digunakan untuk menunjukkan kadar zat aktif terendah yang dapat ditetapkan secara kuantitatif menggunakan metode uji tersebut. Data linieritas dan perhitungan dapat dilihat pada Tabel 7.

Berdasarkan data pada Tabel 7, terlihat bahwa nilai batas kuantitasi vitamin E 75 HP sebesar 0,0846 mg/mL. Batas kuantitasi digunakan untuk mengetahui batas konsentrasi terendah suatu analit yang dapat ditentukan secara kuantitatif dengan tingkat presisi dan akurasi yang dapat terukur oleh alat, artinya hasil tersebut menunjukkan konsentrasi

terkecil yang masih dapat memenuhi kriteria presisi dan akurasi.

#### **KESIMPULAN**

Berdasarkan hasil uji kinerja metode penetapan kadar Vitamin E 75 HP pada bahan awal Vitamin E 75 HP secara *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) terhadap parameter uji kesesuaian sistem, spesifitas, linearitas, akurasi, presisi, batas deteksi dan batas kuantitasi teoritis memenuhi syarat keberterimaan. Perlu dilanjutkan konfirmasi batas deteksi, batas kuantitasi, uji robustness dan perhitungan estimasi ketidakpastian agar data parameter validasi metode uji terpenuhi dan dapat dijadikan informasi validitas metode untuk digunakan pada analisis rutin di laboratorium.

#### **DAFTAR PUSTAKA**

- Annisa S., I. Musfiroh, L. Indriati. (2019). Perbandingan Metode Analisis Instrumen HPLC dan UHPLC: Article Review. *Farmaka* Vol 17 N0 3: 189-197)
- Harmita, APT. 2010. *Analisis Fisikokimia*. Jakarta: UI Press.
- ICH. (2022). ICH Guideline Q2(R2) on Validation of Analytical Procedures. Netherlands
- Kementerian Kesehatan RI. Direktorat Jenderal Kefarmasian dan Alat Kesehatan. (2020). *Farmakope Indonesia Edisi VI*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia
- Lampi, A.M. (2019). Analysis of Tocopherols and Tocotrienols by HPLC. *AOCS*. Finlandia: University of Helsinki.
- Pubchem. (2025). Vitamin E. National Library of Medicine. *National Center for Biotechnology Information*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Vitamin-E>
- Ramadhan S.A. dan I. Musfiroh. (2021). Review Artikel: Verifikasi Metode Analisis Obat. *Farmaka* Vol. 19 No. 3: 87-92.
- Winarsi, H. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kanisius.
- Wong, Y.F., A. Makahleh, B. Saad, M. Nasir, M. Ibrahim, A.A. Rahim, N. Brosse. (2014). UPLC Method For the Determination of Vitamin E Homologues and Derivatives In Vegetable Oils, Margarine and Supplement Capsules Using Pentafluorophenyl Column. *Talanta* Vol 130, 299-306
- Wood, R.A & H., Wallin. (1998). *Quality in The Food Analysis Laboratory The Royal Society of Chemistry*. Inggris: Cambridge.